

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591311

研究課題名(和文) 膵細胞の甘味受容体：グルコース応答における意義の解明

研究課題名(英文) Sweet Taste Receptor in Pancreatic Beta-cell : Investigation for Glucose Response

研究代表者

中川 祐子 (Nakagawa, Yuko)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：90422500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでグルコースが代謝を介さない機構により素早いCa²⁺、cAMP、DAG増加を惹起し、これらが甘味感知受容体(STR)活性化によること、STRシグナル抑制によりグルコース誘発性インスリン分泌(GIIS)が部分的に抑制されることを報告した。膵島ペリフェュージョン系でGIISを測定すると、GSR阻害剤グルマリンはGIISの第1相だけでなく、第2相をも抑制した。この結果はSTRシグナルが代謝依存性の経路と関連する可能性を示唆する。そこでルシフェラーゼ遺伝子導入した細胞を用いてATPレベルの変化をモニターしたところ、低濃度STR刺激によりATPの産生が増加することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we addressed whether or not the sweet taste receptor (STR) expressed in β -cells modulates metabolism of glucose. To this end, we monitored changes in intracellular ATP ([ATP]_c) in MIN6 cells expressing luciferase. High concentrations of glucose induced biphasic increase in [ATP]_c, which was inhibited by an addition of mannoheptulose or dinitrophenol. In the presence of 5.5 mM glucose, addition of sucralose, an activator of STR, induced an immediate and marked elevation of [ATP]_c. Sucralose potentiated the effect of glucose and also augmented methylsuccinate-induced elevation of [ATP]_c.

In the presence of 5.5 mM glucose, addition of 3-O-methylglucose (MeGlc), a non-metabolizable analogue of glucose, induced a transient increase in [ATP]_c, which corresponded to the first peak of the glucose-induced elevation of [ATP]_c or dinitrophenol. These results indicate that activation of STR primes the metabolic pathway and enhances ATP production.

研究分野：内分泌学

キーワード：膵細胞 代謝 ATP 甘味受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、一般に認められている定説では、グルコースは Glut2 を介して細胞内に取り込まれ、解糖系により代謝される。このとき産生された ATP あるいは ATP/ADP の濃度比が増加することで ATP 感受性 K⁺チャネル (K_{ATP}チャネル) が抑制され、脱分極が起きる。これにより電位依存性 Ca²⁺チャネルが活性化され細胞内 Ca²⁺が上昇する。これがインスリン顆粒の開口放出を引き起こす。この他にも K_{ATP}チャネルを介さない経路が存在するが、いまだ不明な点も少なくない。

(2) 申請者は膵細胞のセカンドメッセンジャーの動態を可視化する測定系を確立し、その鋭敏な測定系を用いてグルコース応答シグナル伝達機構を解析してきた。その結果、以下のような特筆すべき結果を得た。プロテインキナーゼ C (PKC) の基質 MARCKS を用いて、グルコース添加後の PKC のリン酸化活性を経時的に観察すると、グルコース添加後わずか数秒以内に PKC が活性化され始めた。この結果を裏付けるように、グルコース添加後やはり数秒以内にジアシルグリセロール (DAG) の増加が見られた。さらにこのとき、cAMP 濃度も素早くかつ持続的に増加した。興味深いことにこれらの素早いグルコース応答は、代謝阻害剤で抑制されず、代謝されないグルコースアナログで再現できることから、一連の素早い応答は「グルコース代謝非依存的な応答」であることが考えられる。これまで申請者は舌で甘味を感知する甘味受容体が膵細胞にも発現し、甘味受容体アゴニストにより、cAMP や Ca²⁺ また DAG の上昇および PKC の活性化を惹起し、インスリン分泌を促進することを報告した。(PLoS One, 4: e5106, 2009)。次の興味とし

て、この受容体が「グルコース代謝非依存的な応答」に関与するかどうかということになる。この点に関して、最近、甘味受容体をノックダウンすると、上述の素早いグルコース応答性のシグナルが消失し、グルコース応答性インスリン分泌が抑制されることを見いだした。さらにマウスの臍灌流実験より甘味受容体の阻害剤グルマリリンがグルコース応答性インスリン分泌の第 1 相だけでなく第 2 相も抑制した。これらの結果は、グルコース応答性インスリン分泌に甘味受容体を介した新規の経路が関与することを示唆している。この新規経路は第 2 相の分泌にも関与することから、従来知られている「代謝依存性経路」とも関連している可能性がある。

2. 研究の目的

予備検討の結果、甘味受容体は、代謝依存的な経路にも関与する可能性が考えられた。そこで NADH 量および ATP 産生量をモニターし、甘味受容体アゴニストを添加することにより代謝が促進されるかを検討した。またグルコースの代わりにコハク酸を投与して同様の検討を行った。甘味受容体シグナルがグルコース代謝に影響することが明らかにし、その後、代謝のどのステップに影響するかを検討した。具体的には、甘味受容体の阻害剤であるグルマリリンの投与および甘味受容体の構成因子の 1 つである T1R3 の siRNA を用いたノックダウンにより甘味受容体シグナルを遮断して、甘味受容体が代謝経路のどのステップに関与するか詳細な検討を行った。特に甘味受容体は Ca²⁺シグナルを惹起することが分かっているため、Ca²⁺依存的な酵素(ピルビン酸脱水素酵素や TCA 回路の 2 種類の脱水素酵素)にターゲットを絞り、甘味受容体シグナルが抑制された条件下で酵素活性に変化が見られるか否か解析を行っ

た。

3. 研究の方法

(1) 甘味受容体アゴニストが代謝におよぼす効果の検討

まず甘味受容体アゴニストによりこの受容体を活性化した際にグルコース代謝がどのように変化するかを検討した。MIN6 細胞に甘味受容体アゴニストを添加して受容体を活性化した。NADH 量および ATP 産生量をモニターすることにより代謝に対する効果を検討した。また、グルコースの代わりに中間代謝産物であるコハク酸を投与し、同様の検討を行った。

これまでの検討から、甘味受容体の活性化により細胞内 Ca^{2+} が上昇することが明らかとなっている。そのため、甘味受容体は代謝経路に存在する Ca^{2+} 依存性酵素(ピルビン酸脱水素酵素、 NAD^+ -イソクエン酸脱水素酵素、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素)の活性を制御している可能性が考えられる。甘味受容体アゴニストにより、これらの酵素が局在するミトコンドリア内の Ca^{2+} の動態に変化が見られるか検討を行った。

(2) グルコース代謝における甘味受容体の作用機序の特定

甘味受容体の阻害剤であるグルマリンの投与および甘味受容体の構成因子の1つである T1R3 の siRNA を用いたノックダウンにより甘味受容体シグナルを遮断して、甘味受容体が代謝経路のどのステップに関与するか詳細な検討を行った。

膵細胞の細胞株である MIN6 細胞を用いて、細胞内の ATP 濃度変化を感知するインジケーターを導入し、リアルタイムモニターした。T1R3 siRNA を導入して甘味受容体をノックダウンし、グルコース応答性の ATP 産生量の変化を検討した。

グルコース応答の際、甘味受容体から発生した Ca^{2+} シグナルがミトコンドリア内の Ca^{2+} 上昇にどのような変化をおよぼすか検討を行った。具体的には、MIN6 細胞に細胞

質の Ca^{2+} 濃度をモニターする Fluo-4 とミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度をモニターする Rhod-2 を同時に導入し、甘味受容体ノックダウンにより細胞質・ミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度変化に対する効果を検討した。

ミトコンドリアにプールされた NADH 量をモニターするために NAD(P)H 自家蛍光を測定した。甘味受容体をノックダウンし、グルコースによる NADH 量の変化に影響があるか否か検討した。

4 研究成果

(1) グルマリンによるグルコースの抑制作用

これまでの検討より、申請者はグルコースの代謝を介さない作用について報告してきた。 β 細胞にグルコースを添加するとその直後に Ca^{2+} や cAMP の上昇、そして DAG の産生亢進また PKC によるリン酸化が惹起された。この応答の一部は、甘味受容体の阻害剤であるグルマリンや、甘味受容体の構成因子である T1R3 の発現を抑えることによりシグナルが消失または変化した。これは、グルコースが代謝に依存せずに甘味受容体を介して素早いシグナルを発生させることを示唆する。このシグナルの生理的機能を明らかにするために、甘味受容体の阻害剤を用いてグルコース応答性インスリン分泌を検討した。図 1A に示すように、コントロールと比較して、甘味受容体の阻害剤であるグルマリン存在下では、高濃度グルコース存在下において、有意にインスリンの分泌抑えた。さらにマウスの膵灌流実験の結果(図 1B)から、グルマリン存在下では、グルコース応答性インスリン分泌の第 1 相目および第 2 相目とも抑制された。この結果は、グルコース応答性インスリン分泌に甘味受容体が関与することを示唆するとともに、甘味受容体が従来知られている「代謝依存性経路」とも関連している可能性を示唆する。

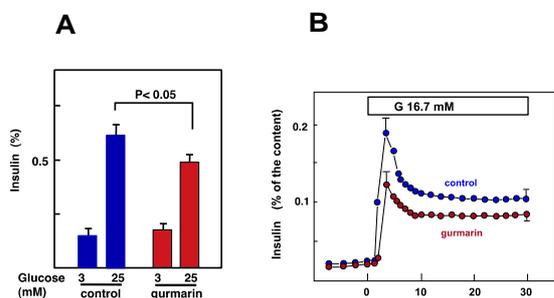


図 1. グルコース応答性インスリン分泌におけるグルマリンの効果. A. MIN6 におけるグルコース応答性インスリン分泌. B. 単離膵島におけるグルコース応答性インスリン分泌.

(2) ATP 測定方法の確立

次に甘味受容体シグナルが代謝依存性経路に關与するか否か検討を行うために、測定系を構築した。MIN6 細胞に Luciferase を導入し、D-Luciferin を添加した。このシステムによりグルコースの濃度に発光強度が増強した。また、代謝阻害剤であるマンノヘプテュロースやミトコンドリアのアンカップラーである dinitrophenol では発光が抑制された。これに対して、ミトコンドリアフューエルであるコハク酸の添加では、濃度依存的に発光強度が増強した。以上のことより、Luciferase-Luciferin システムにより、ATP 産生量を測定することが可能となった。

(3) スクラロースによる ATP 産生

グルコース応答性インスリン分泌に甘味受容体が關与し、甘味受容体が代謝依存性経路に連關している可能性が示唆されたため、次に甘味受容体シグナルが代謝依存性経路に關与するか否か検討を行った。まず、甘味受容体アゴニストであるスクラロースにより刺激することで ATP 産生作用に変化が見られるか否か測定した。その結果、3 mM スクラロースにより、急峻な上昇とそれに続く持続的で大きな上昇が増強される二相性の上昇が見られた (図 2 A)。また、この ATP

上昇はスクラロースの濃度依存的に増強された (図 2 B)。この結果は、スクラロースがそれ自身代謝されないで、甘味受容体を介して、代謝シグナルが増強されたものと考えられる。

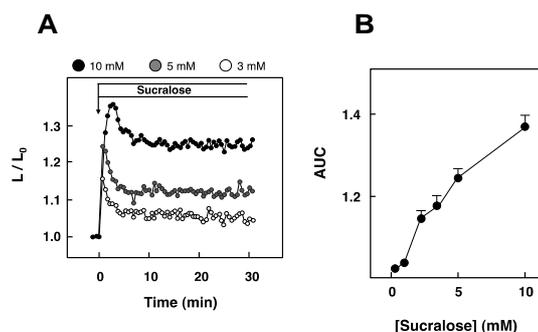


図 2. ATP 産生におけるスクラロースの効果. A. スクラロースによる ATP 産生量の変化. B. スクラロース濃度に依存した ATP 産生の変化.

(4) ATP 産生におけるスクラロースの作用

スクラロースがミトコンドリアを活性化するか否か明らかにするために、ミトコンドリアフューエルであるコハク酸をもちいてスクラロースの作用を検討した。コハク酸は、モノフェジックな ATP 上昇を示したが、スクラロースとともに作用させると、刺激直後に急峻で持続的な上昇を示した。それぞれの AUC を比べてみると、スクラロースとコハク酸を入れた物は、単独の物に比べ、アディティブ以上の効果を示した。スクラロースはそれ自身細胞に取り込まれず、代謝もされないで、甘味受容体を介して、ミトコンドリアの代謝シグナルを増強すると考えられる。

次にスクラロースが 8.3mM Glucose を potentiate するかを検討した。スクラロースと共に作用させると、グルコース単独に比べ、一相目および二相目とも増強された。それぞれの AUC をとり、比較すると、スクラロースとグルコースを同時に作用させることで、ATP 産生が増強されることが分かった。したがって、この結果は甘味受容体がグルコース応答性 ATP 産生作用を何らかのメカニズムで

増強していることを示唆する。

続いてグルコースによる甘味受容体の活性化を検討するために、代謝されない MeGlc を用いて検討を行った。グルコースは、バイフェージックな応答を示した。一方、代謝されない MeGlc では、一過的な上昇が見られた。MeGlc はグルコースと同様に細胞内に入るが一切代謝されない。おそらくこの作用は甘味受容体を介して、代謝シグナルを増強しているものと考えられる。次にこの一相目の ATP 上昇に注目して検討を行った。10 mM という比較的低い濃度で、ATP の一過的な上昇が観察された。さらに MeGlc の濃度を高くすると、濃度依存的に第一相目の ATP 産生量が増強することが分かった。

続いてミトコンドリアフューエルであるコハク酸を用いて検討を行った。コハク酸単独ではモノフェージックな上昇を示したが、ここに MeGlc を加えると、刺激直後に急峻な上昇とそれに続く持続的な上昇が見られた。MeGlc は、それ自身代謝されないため、MeGlc がミトコンドリアにプライミング作用を及ぼし、それにより細胞外から加えられたミトコンドリアフューエルがより効果的に代謝され、ATP 産生が増強したと考えられる。

甘味受容体活性化がグルコース作用をどのように修飾するかを検討するために 8.3 mM グルコース存在下で MeGlc 作用を検証した。グルコースはバイフェージックな応答を示す。ここに一過的な上昇を示す MeGlc を加えると一相目の小さなピークがさらに増強され、二相目の持続的な上昇もグルコース単独の物に比べ、大きくなった。MeGlc は代謝されませんので、甘味受容体を介してグルコースの代謝シグナルに働きかけ、ATP 産生を増強すると考えられる。

(5) ATP 産生における甘味受容体の機能

最後に、グルコースの ATP 産生作用に T1R3 が関与しているか、検討を行った。shT1R3 を導入し、T1R3 の発現を 60%ほど

に抑制した。コントロールと比べて、一相目および二相目の上昇が抑えられた。この結果は、グルコースの ATP 産生作用に甘味受容体が関与していることを示唆する。

以上の結果をもとに新たなグルコース作用モデルを構築した(図3)。従来の代謝依存経路に加え、今回の結果は、グルコースが代謝されることなくその作用を発揮し、ATP 産生を強化する経路が存在することを示唆した。まず早い応答として、グルコースは甘味受容体を刺激しミトコンドリアをプライミングする。その後 GLUT2 を介してグルコースが流入すると、代謝を相乗的に促進し、ATP 産生に寄与するものと考えられる。

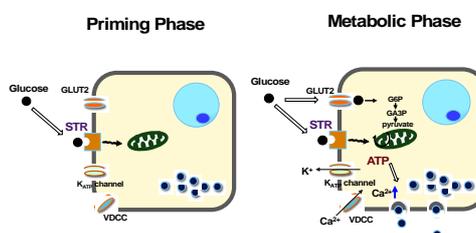


図3. グルコース作用の新たなモデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Ohtsu Y, Nakagawa Y, Nagasawa M, Takeda S, Arakawa H, Kojima I. Diverse signaling systems activated by the sweet taste receptor in human GLP-1-secreting cells. *Mol. Cell Endocrinol. J.*, 査読有, 394 (1-2): 70-79, (2014).

Medina A, Nakagawa Y, Kojima I. (他5名, 2番目)

Expression of the glucose-sensing receptor T1R3 in pancreatic islet: changes in the expression levels in various nutritional and metabolic states. *Endocr. J.*, 査読有, 61 (8): 797-805, (2014).

Nakagawa Y, Ohtsu Y, Nagasawa M, Shibata H, Kojima I. Glucose promotes its own metabolism by acting on the cell-surface glucose-sensing receptor T1R3. *Endocr. J.*, 査読有, 61 (2): 119-131, (2014).

Ma J, Nakagawa Y, Kojima I, Shibata H. Prolonged insulin stimulation down-regulates GLUT4 through oxidative stress-mediated retromer inhibition by a protein kinase CK2-dependent mechanism in

3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 289 (1): 133-142, (2014).

Nakagawa Y, Nagasawa M, Mogami H, Lohse M, Ninomiya Y, Kojima I. Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells: generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists. *Endocr. J.*, 査読有, 60 (10): 1191-1206, (2013).

Sasaki T, Nakagawa Y. (他14名, 5番目), Miglitol prevents diet-induced obesity by stimulating brown adipose tissue and energy expenditure independent of preventing the digestion of carbohydrates.

Endocr. J., 査読有, 60 (10): 1117-1129, (2013).

Nakagawa Y, Nagasawa M, Mogami H, Lohse M, Ninomiya Y, Kojima I. Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells: generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists. *Endocr. J.*, 査読有, 60 (10): 1191-1206, (2013).

Masubuchi Y, Nakagawa Y. (他7名, 2番目). A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *PLoS One*, 査読有, 8; e54500 (2013).

Nakagawa Y. Function of sweet taste receptor in pancreatic beta-cells. *生化学*, 査読有, 83 (7): 647-651, (2011).

Mashima H, Nakagawa Y, Kojima I, Ohnishi H. Interferon regulatory factor-2 regulates exocytosis mechanisms mediated by SNAREs in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*, 査読有, 141(3): 1102-1113, (2011).

〔学会発表〕(計 5件)

Nakagawa Y. Expression of the Glucose-sensing Receptor T1R3 in Pancreatic Islets. American Diabetes Association 74th scientific sessions. June 15 2014. San Francisco.

中川祐子. 膵細胞におけるグルコース感知受容体 T1R3 の発現変化. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会. 2014年5月24日 大阪.

Nakagawa Y. Activators of the Sweet Taste Receptor Energize Mitochondria and Augment ATP Production in Glucose-responsive MIN6. Beta Cell Workshop 2013. March 24 2013. Kyoto.

中川祐子. グルコース作用における甘味受容体の関与: 代謝経路との連関. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会. 2013年5月15日 熊本

中川祐子. 膵細胞におけるグルコース作用: 代謝に依存しないcAMPシグナル伝達経路の解明. 第55回日

本糖尿病学会年次学術集会. 2012年5月27日 岡山

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 祐子 (Nakagawa, Yuko)
群馬大学・生体調節研究所・助教
研究者番号: 90422500

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: